

University of Groningen

Adaptation to environmental stress in different life stages of *Drosophila melanogaster*

Malherbe, Yvan

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2005

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Malherbe, Y. (2005). *Adaptation to environmental stress in different life stages of Drosophila melanogaster*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Samenvatting



Darwins theorie over de biologische evolutie, met natuurlijke selectie als drijvende kracht, is neergelegd in “*On the Origin of Species by Means of Natural Selection*” (1859), waarin talloze waarnemingen op nauwkeurige en scherpzinnige wijze worden geanalyseerd en bediscussieerd. Lang zijn intra- en interspecifieke competitie beschouwd als de belangrijkste factoren die betrokken zijn bij adaptatie en evolutie. Meer recent is aangetoond dat ook andere milieu-invloeden een grote invloed hebben op de genetische structuur van populaties en op de evolutie van biologische systemen (Calow en Berry, 1989; Hoffmann en Parsons, 1991; Bijlsma en Loeschcke, 1997). Een milieustressfactor kan worden gedefinieerd als een milieufactor die Darwiniaanse fitness verlaagt. Het voorkomen van dit soort effecten die hoge selectiedrukken veroorzaken, is wellicht niet erg frequent, maar de evolutionaire gevolgen van milieustress, van moleculair tot ecosysteem niveau, zijn vaak aanzienlijk. Omgevingsstress kan zelf een rol in het macro-evolutionaire soortvormingsproces spelen (Parsons, 1997; Sheldon, 1997).

Holometabole insecten vertonen een volledige gedaanteverwisseling, waarbij het larvale stadium volledig verschilt van het volwassen stadium. De larvale stadia zijn gespecialiseerd in groei, terwijl de adulte levensfase gericht is op dispersie en voortplanting. Larven en adulten verschillen meestal sterk in anatomie en uiterlijk, leven vaak onder verschillende milieuomstandigheden en vertonen sterke biochemische en fysiologische verschillen. Eén bepaalde milieufactor kan op verschillende levensstadia een verschillend effect hebben. De adaptieve reactie op een dergelijke stressfactor kan specifiek zijn voor een bepaalde levensfase (Loeschcke en Krebs, 1996). Ook kan een adaptieve reactie op een bepaalde stressfactor in een bepaald levensstadium van invloed zijn op de andere levensstadia. Het doel van dit proefschrift is om de genetische effecten te analyseren die een stressfactor heeft op de verschillende levensstadia van een holometabool insect.

Alcoholresistentie in de fruitvlieg *Drosophila melanogaster* is onderwerp geweest van vele onderzoeken (zie: Van Delden en Kamping, 1997). Deze resistentieontwikkeling tegen verschillende alcoholen en ethanol in het bijzonder biedt een voortreffelijk modelsysteem om de effecten van milieustress te onderzoeken. In de natuur fungeert rottend fruit, waarin door fermentatie ethanol kan ontstaan, als voedingsbron en als het substraat waarin eieren worden gelegd. De aanwezigheid van toxische ethanol

concentraties vormt een aanzienlijke milieustressfactor. Adulten van *D. melanogaster* zijn bij voedselopname en ovipositie in contact met het giftige alcohol. Eieren en larven zijn continu in contact met ethanol en kunnen daaraan niet ontsnappen, hoe hoog en toxisch de alcoholconcentratie ook mag zijn. Ethanol in het fruit kan dus alle levensstadia beïnvloeden. Echter, voedselopname en ovipositie van adulten houdt geen voortdurende blootstelling aan ethanol in; de selectiedruk voor adulten is dan ook waarschijnlijk lager dan voor de larven (Boulétreau en David, 1981).

Alcohol dehydrogenase (ADH: EC:1.1.1.1) is een sleutelenzym in de metabolische afbraakketen van alcoholen van *D. melanogaster* en is essentieel voor overleving in milieus waarin alcoholen aanwezig zijn. Dit wordt, ondermeer, aangetoond door de grote gevoeligheid voor alcohol van nulmutanten voor het alcohol dehydrogenase (*Adh*) gen (David *et al.*, 1976). De twee algemeen voorkomende varianten van dit gen, *Adh^S* en *Adh^F*, verschillen in één nucleotide. De drie betrokken genotypen verschillen sterk in *in vitro* ADH-enzymactiviteit: de ADH-activiteit van *Adh^{FF}* individuen is, in het algemeen, ongeveer drie keer zo hoog als die van de *Adh^{SS}* homozygoten, terwijl de heterozygoten *Adh^{SF}* een intermediaire activiteit vertonen (Van Delden, 1982; Chambers, 1988, 1991; Heinstra, 1993). Meestal is de overleving op alcohol bevattend voedsel positief gecorreleerd met ADH-activiteit: *Adh^{FF}* individuen bezitten een hogere alcoholresistentie dan *Adh^{SS}* individuen terwijl die van *Adh^{SF}* heterozygoten tussen die van de beide homozygoten inligt. Echter, zowel ADH-activiteit als alcoholresistentie vertonen grote verschillen tussen populaties en binnen populaties van *D. melanogaster*. Zelfs binnen een bepaald *Adh* genotype bestaan genetische verschillen in ADH-activiteit en alcoholresistentie.

Alcoholresistentie bij *D. melanogaster* omvat verschillende mechanismen. Sommige verschillen zijn waarschijnlijk aan het levensstadium gebonden en kunnen daarvoor specifiek zijn. Om deze mechanismen te bestuderen zijn in dit proefschrift drie verschillende selectieprocedures toegepast om de resistentie tegen ethanol te verhogen in bepaalde levensstadia. Gebruik werd gemaakt van twee lijnen, één homozygoot voor *Adh^S* en één homozygoot voor *Adh^F* die beiden afkomstig waren uit één oorspronkelijke basispopulatie. Voor beide genotypen werden selectielijnen opgezet om ethanolresistentie te verhogen in het adulte stadium (ADU-SS en ADU-FF) ofwel in het larvale stadium (LAR-SS en LAR-FF) ofwel gedurende het gehele leven (WHO-SS en

WHO-FF). Daarnaast werden de twee oorspronkelijke lijnen als controles aangehouden op normaal, geen ethanol bevattend, voedsel (CON-SS en CON-FF) **[Hoofdstuk 2]**.

Bij de eerste selectieprocedure (ADU) werden individuen geselecteerd op alcoholresistentie in het volwassen levensstadium door ze alleen als vliegen bloot te stellen aan voer met alcohol. Gedurende de juveniele stadia kwamen de individuen nooit in contact met alcohol. De vliegen konden paren en de ♀♀ eieren leggen op normaal voer. De larven groeiden op in voedsel zonder alcohol en de uit de poppen komende vliegen werden overgebracht op normaal voedsel waarin ze één week verbleven. Daarna werden deze vliegen overgebracht in flessen met alcoholhoudend voedsel. Wanneer ongeveer een kwart van de vliegen dood was, werden de overlevenden overgebracht naar flessen met normaal voedsel, waarin gedurende 24 uur eieren gelegd konden worden om de volgende generatie te vormen.

Bij de tweede selectieprocedure (LAR) daarentegen, werden de juveniele stadia gehouden in alcohol bevattend voedsel, terwijl de adulten op normaal voedsel werden gehouden. Pas uitgekomen vliegen werden één week op normaal voer gehouden. De ♀♀ konden daardoor gedurende vier uur eieren leggen op normaal voedsel, waarvan de eieren werden overgebracht in flessen met alcoholhoudend voedsel. De uitkomende larven voedden en ontwikkelden zich in dit voedsel, waarna ze zich verpopten. De uitkomende vliegen werden dagelijks overgebracht naar nieuwe flessen met normaal voedsel. Hierop werden de vliegen een week gehouden voordat de volgende generatie werd gestart.

Bij de derde selectieprocedure (WHO) werden de individuen continu op alcoholhoudend voedsel gehouden gedurende hun gehele levenscyclus. De ♀♀ legden eieren op alcohol bevattend voedsel, de larven groeiden hierin op en de adulten werden er gedurende één week op gehouden. Daarna werden de vliegen overgebracht naar flessen met alcoholhoudend voedsel om de ♀♀ de gelegenheid te geven eieren te leggen die de volgende generatie zouden vormen. De twee oorspronkelijke populaties werden als controle populaties (CON) gedurende de gehele levenscyclus, en van generatie tot generatie, op normaal voedsel gehouden.

Na 20 (LAR en WHO selectieprocedures) of 25 (ADU selectieprocedure) generaties selectie, werden de directe reacties op de uitgevoerde selectie (de overleving van de adulten en de overleving van ei tot het adulte stadium op alcohol bevattend voedsel) bepaald en vergeleken met de CON-lijnen. Daarnaast werden ook de indirecte reacties op selectie (ADH-activiteit, lichaamsgewicht, eiwitgehalte en ontwikkelingstijd) onderzocht voor de controle en selectielijnen. **[Hoofdstuk 2]** Een significante toename in adulte overleving werd waargenomen in de lijnen geselecteerd voor alcoholresistentie in het adulte stadium (ADU-SS en ADU-FF). Echter, in de lijnen geselecteerd voor juveniele resistentie (LAR-SS en LAR-FF) was de toename in resistentie niet significant. Bij de lijnen die geselecteerd waren op resistentie gedurende de gehele levenscyclus (WHO-SS en WHO-FF) was er alleen een significante resistentietoename in *Adh^{FF}* ♂♂. Daarentegen nam de overleving van ei tot volwassene significant toe in zowel de LAR als de WHO lijnen voor beide *Adh* genotypes. Dit was niet het geval bij de ADU-SS en ADU-FF lijnen. De toename in alcoholresistentie was dus specifiek voor het levensstadium waarin geselecteerd was. De directe reacties op selectie geven aan dat een specifieke stressfactor een specifieke selectie reactie kan oproepen in een bepaalde levensfase.

De directe selectiereacties voor overleving gingen vergezeld van verschillende indirecte reacties op selectie. Zo bleek toename in ADH-activiteit in adulten verbonden te zijn met de toename in adulte overleving op alcoholhoudend voedsel in de ADU-lijnen, terwijl larvale ADH-activiteit gelijk was in LAR- en CON-lijnen. Een toename in lichaamsgewicht, gekoppeld aan een toename in ontwikkelingstijd werd waargenomen in de *Adh^{FF}* selectielijnen en speelt waarschijnlijk een rol bij de toename in adulte en juveniele overleving. Deze reacties op selectie geven aan dat alcoholresistentie een complexe eigenschap is, waarbij waarschijnlijk verschillende genen zijn betrokken. De resultaten met betrekking tot ADH-activiteit bevestigen dat de reacties op alcohol in het voedsel verschillen met het levensstadium. Een toename in constitutief ADH is gekoppeld aan de toename in adulte overleving, maar dit is niet het geval voor juveniele alcoholresistentie. De toename in lichaamsgewicht duidt aan dat een stressfactor kan leiden tot diverse reacties. Deze reacties behoeven niet altijd specifiek te zijn voor deze bepaalde stressfactor, maar kunnen verschillende evolutionaire reacties in een populatie teweegbrengen.

De rol van ADH bij de specifieke toename in alcoholtolerantie van bepaalde levensstadia werd verder geanalyseerd na 40 (LAR en WHO) of 45 (ADU) generaties selectie. **[Hoofdstuk 3]** De resultaten verkregen voor juveniele en adulte overleving op alcoholhoudend voedsel bevestigen de resultaten die werden verkregen na 20 of 25 generaties selectie. Selectie voor toename van alcoholresistentie leidde veelal tot positieve resultaten in adulten, bij de verschillende wijzen van selectie. Voor de juveniele overleving werd een stijging van resistentie uitsluitend aangetroffen bij die selectieregimes waarin tijdens het larvale stadium werd geselecteerd. Selectie in het larvale stadium heeft dus ook effecten in het volwassen stadium voor wat betreft resistentie. Het is waarschijnlijk dat dezelfde metabolische adaptaties resistentie bepalen in adulten en larven. Echter, de specifieke ontwikkelingsprocessen in larven maken aanvullende metabolische aanpassingen in dit juveniele levensstadium noodzakelijk.

De toename van de adulte overleving in de ADU-SS en ADU-FF lijnen werd vergezeld door een toename van ADH-activiteit in adulten. De toename in ei-adult overleving in LAR-SS en LAR-FF daarentegen ging niet samen met een significante toename in larvale ADH-activiteit. Het is waarschijnlijk dat de rol van ADH in de toename van alcoholresistentie afhankelijk is van het levensstadium en van het *Adh* genotype. Een positieve correlatie tussen ADH eiwitgehalte en alcoholtolerantie voor adulten maar niet voor larven, werd reeds eerder beschreven door Geer *et al.* (1993). Het is mogelijk dat in larven verhoging van ADH-activiteit in conflict zou raken met andere metabolische processen. Mogelijk is ADH betrokken bij andere metabolische ketens dan alleen die van de afbraak van ethanol (Oppentocht *et al.*, 2002).

De aanwezigheid van alcohol in het voedsel van *D. melanogaster* induceert een toename van *Adh*-expressie en ADH-activiteit in larven en, in geringere mate, in adulten. **[Hoofdstuk 4]** De toename in alcoholresistentie van adulten ging vergezeld van een toename in adulte ADH-activiteit in *Adh^{FF}* individuen van de selectielijnen indien getest op voedsel met alcohol. In de *Adh^{SS}* selectielijnen daarentegen nam de adulte ADH-activiteit niet toe op alcoholvoedsel. De toename van larvale ADH-activiteit op alcoholvoedsel was ook sterker in de *Adh^{FF}* selectielijnen vergeleken met de controlelijn. Voor LAR-SS was de toename echter gelijk aan die van CON-SS. Met betrekking tot ADH-activiteit blijken de selectiereacties verschillen te vertonen tussen de *Adh* genotypen. Eerder onderzoek (Choudhary en Laurie, 1991; Laurie *et al.*, 1991)

toonde reeds aan dat *Adh*mRNA niveaus niet noodzakelijkerwijs gecorreleerd zijn met ADH-activiteit of alcoholtolerantie. De regulatie van ADH-activiteit kan tot stand komen op verschillende niveaus (Stam en Laurie, 1996; Carlini, 2004). De gevonden verschillen tussen de twee *Adh* genotypen bevestigen echter de hypothese dat bij adaptatie aan hoge concentraties alcohol waarschijnlijk ook andere fysiologische systemen zijn betrokken.

Voor twee van de geselecteerde lijnen, ADU-FF en LAR-SS, werden reciproke kruisingen tussen selectielijnen en controlelijnen uitgevoerd. **[Hoofdstuk 5]** De nakomelingen werden getest op adulte alcoholresistentie (ADU-FF x CON-FF) of juveniele alcoholresistentie (LAR-SS x CON-SS). In beide gevallen toonden de resultaten aan dat er geen effecten van het X-chromosoom waren. Bij de eerste kruising bleek een algemeen co-dominant effect voor de toename in adulte alcoholresistentie. Resultaten van de tweede kruising duiden op een dominant effect voor de toename in juveniele alcoholresistentie. In een verder experiment werden kruisingen gemaakt met een “balanced marker” lijn. Hierbij werden verschillende genotypen geconstrueerd om de effecten van X-chromosoom, tweede en derde chromosoom van de twee geselecteerde lijnen op de toegenomen adulte dan wel juveniele resistente te kunnen vaststellen. In alle gevallen bleek het X-chromosoom geen effect te hebben, terwijl het tweede chromosoom steeds een significant effect had op zowel adulte als juveniele tolerantie voor alcohol. Het derde chromosoom van LAR-SS had geen effect op alcoholresistentie maar het derde chromosoom van ADU-FF had een significant effect op juveniele tolerantie en adulte tolerantie van ♂♂.

De analyse van de resultaten van de verschillende selectieprocedures met betrekking tot het levensstadium wijst op complexe interacties tussen alcoholstress, levensstadium, geslacht en genotype. Het is duidelijk dat selectie voor toename in alcoholresistentie niet alleen gekoppeld is aan modificaties van het *Adh* gen maar dat het ook effecten heeft op andere eigenschappen als lichaamsgewicht en ontwikkelingstijd. De conclusie is dat verschillende genen betrokken zijn bij de toename in resistentie in de verschillende levensstadia. De eerste resultaten uit onderzoek naar azijnzuurresistentie tonen aan dat bij deze tweede stressfactor, die vaak gecombineerd optreedt met alcoholstress, waarschijnlijk andere genen zijn betrokken. De resultaten beschreven in dit proefschrift bevestigen het belang van abiotische stressfactoren in evolutionaire

processen. Verder tonen ze aan dat de verschillende levensstadia van een holometabool insect zeer verschillende kunnen reageren op specifieke stressfactoren en dat daarbij verschillende genetische mechanismen betrokken kunnen zijn.